

MAGNETIC PARTICULATE FOR LASER MAGNETIC IMMUNOLOGICAL MEASUREMENT AND ITS MANUFACTURE

Patent number: JP6148189
Publication date: 1994-05-27
Inventor: ARISHIMA KOICHI; FUJIWARA KOICHI
Applicant: NIPPON TELEGRAPH & TELEPHONE
Classification:
- **International:** G01N33/543; G01N21/47; G01N33/53; G01N33/553
- **European:**
Application number: JP19920296205 19921105
Priority number(s): JP19920296205 19921105

Report a data error here

Abstract of JP6148189

PURPOSE: To provide a magnetic particulate for laser magnetic immunological measurement having strong magnetic characteristic and excellent dispersing property by bonding a plurality of aminated dextran-coated magnetic particulates. **CONSTITUTION:** A surfactant is added to aminated dextran-coated magnetic particulates and a bifunctional cross-linking agent, mixed and stirred in oil to generate droplets. The cross-linking reaction is caused between the amino groups of aminated dextran in the droplets to mutually bond a plurality of aminated dextran-coated magnetic particulates. The plurally bonded particulates of large particle size remarkably increase the sensitivity in laser magnetic immunology. This reason is considered that the magnetic characteristic per magnetic particulate is proportional to the contained magnetic body quantity, and it can be avoided by the larger particle size that the sucking force of magnetic field is arrested by Brownian movement. Thus, the magnetic particulate of large particle size having strong magnetic characteristic and good dispersing property is applied to laser magnetic immunological measurement, whereby its sensitivity is enhanced, and the reliability can be improved.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-148189

(43)公開日 平成 6 年(1994) 5 月27 日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	E	9217-2 J		
21/47	Z	7370-2 J		
33/53		8310-2 J		
33/553		9015-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数3(全 6 頁)

(21)出願番号	特願平4-296205	(71)出願人	000004226 日本電信電話株式会社 東京都千代田区内幸町一丁目1番6号
(22)出願日	平成 4 年(1992)11月 5 日	(72)発明者	有島 功一 東京都千代田区内幸町1丁目1番6号 日 本電信電話株式会社内
		(72)発明者	藤原 幸一 東京都千代田区内幸町1丁目1番6号 日 本電信電話株式会社内
		(74)代理人	弁理士 志賀 正武

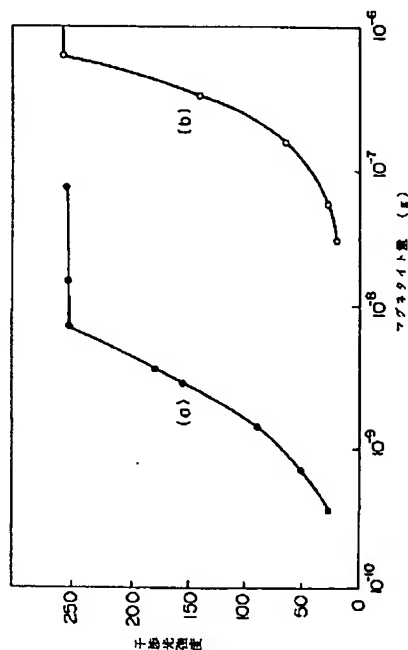
(54)【発明の名称】 レーザ磁気免疫測定用磁性微粒子およびその作製法

(57)【要約】

【目的】 磁気特性が大きく分散性に優れたレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子およびその作製法の提供を目的とするものである。

【構成】 磁性微粒子で標識した抗体で抗原を捕捉後、これを磁界で水面上に凝集させ水面の隆起量をレーザ干渉光強度で測定するレーザ磁気免疫測定方法における前記磁性微粒子は、アミノ化デキストラン被覆磁性微粒子の複数個が結合してなるものであることを特徴とするレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子。

【効果】 レーザ磁気免疫測定方法における高感度化を図り、そのデータの信頼性の高めることができる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 磁性微粒子で標識した抗体で抗原を捕捉後、これを磁界で水面上に凝集させ水面の隆起量をレーザ干渉光強度で測定するレーザ磁気免疫測定方法における前記磁性微粒子は、アミノ化デキストラン被覆磁性微粒子の複数個が結合してなるものであることを特徴とするレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子。

【請求項2】 アミノ化デキストラン被覆磁性微粒子と2官能性架橋剤を油中で混合攪拌し液滴を生成後、当該液滴内でアミノ化デキストランのアミノ基間で架橋反応を起こし、アミノ化デキストラン被覆磁性微粒子を複数個結合させることを特徴とする請求項1に記載のレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子の作製法。

【請求項3】 液滴を生成する際に、アミノ化デキストラン被覆磁性微粒子と2官能性架橋剤に、さらに界面活性剤を添加し油中で混合攪拌して、液滴を生成させることを特徴とする請求項2に記載のレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子の作製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、抗原抗体反応を利用した免疫測定法のひとつであるレーザ磁気免疫測定法に使用するレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子およびその作製法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来から知られている抗原抗体反応を利用した検出法としては、ラジオイムノアッセイ(RIA)、酵素イムノアッセイ(EIA)、蛍光イムノアッセイ(FIA)、レーザイムノアッセイ(LIA)等が既に実用化されている。これらの方法は、それぞれアイソトープ、酵素、蛍光物質を標識として付加した抗原の有無を検出する方法である。

【0003】しかしながら、上記EIA法、FIA法、LIA法の感度は、 10^{-8} gからせいぜい 10^{-10} gであり、ウイルスの感染初期診断や微量なホルモン検査などの抗原そのものを検出する免疫測定においては、感度不足であり、実用上の問題があった。また、RIA法については、その感度は 10^{-11} gと、超微量分析や抗原検査をするには充分可能であるが、放射性物質を利用するため特殊設備を必要とし、安全性、汎用性、価格等の点で問題があった。

【0004】そこで本願発明者らは抗原検査が可能な 10^{-11} g以上の感度を有し、かつ汎用性の高い測定法としてレーザ磁気免疫測定方法を提案してきた。(特開昭63-79070、特開昭63-106559、特開昭63-108265、特開昭63-188766、特開昭63-315951、特開平1-29768など。)これらの新しい測定方法は、抗原抗体反応後、ポリマビーズに結合した抗原を磁性微粒子で標識し、この磁性微粒子で標識されたポリマビーズを磁界で水面上に凝集さ

せ、凝集による水面の隆起量をレーザ干渉光の強度で測定する方法である。よって、上記レーザ磁気免疫測定方法は磁界による凝集効果とレーザ光の干渉による高感度変位測定のため、感度はRIA法と同等もしくはそれ以上の超微量検出が可能である。

【0005】ここで、レーザ磁気免疫測定法において、その感度を左右する重要な要素の一つは、その測定原理から明らかなように標識材料として用いられている磁性微粒子である。レーザ磁気免疫測定方法に適用される磁性微粒子に関しては、Moldayらが米国特許第4452773号において開示したデキストランに被覆した磁性微粒子がある。この発明は磁性微粒子の周りがデキストランで被覆され、デキストランを酸化処理することによって抗体、あるいはその他のタンパク質を結合し、レーザ磁気免疫測定方法に使用できることを示している。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本願発明者らは、この特許を改良し、レーザ磁気免疫測定方法に適用される磁性微粒子について鋭意検討を重ねてきた。その結果、磁化率の高い磁性微粒子が得られ、特開平3-141119に「磁性微粒子の製造方法」、特開平3-242327に「磁性微粒子の製造方法」として特許出願している。

【0007】これまでの方法で得られた磁性微粒子は電顕観測の結果、直径10nm以下のマグネタイト複数個が、直径100nm程度あるいはそれ以下のデキストランに含有されていることがわかった。しかし、抗原濃度が低い領域では1個のポリマビーズに結合する抗原量が少なくなため、標識される磁性微粒子量もそれに従い少なくなり、ポリマビーズ1個に対する磁界による吸引力が小さくなる。このため、さらに高感度化を図るためには磁性微粒子の「磁界に対する凝集性」(以下「磁気特性」と表現する)の向上が望まれていた。

【0008】磁気特性を向上させる方法としては、

(1) マグネタイトそのものの磁化率を向上させる。

(2) マグネタイトを埋包するデキストランを大きくするなどの方法があった。しかし、上記(1)に記載の方法については、現在の磁化率がほぼ理論限界に近い値が得られており、材料を変更しない限り、その向上は期待できない。上記(2)に記載の方法については、これまでも検討を重ねてきたが、分散性が良く磁性微粒子そのものの粒径を大きくすることは現在の作製法では困難であることが明らかになってきた。よって、本発明は、上記事情に鑑みてなされたもので、磁気特性が大きく分散性に優れたレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子およびその作製法の提供を目的とするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】請求項1に記載のレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子は、上記課題を解決するために、磁性微粒子で標識した抗体で抗原を捕捉後、こ

れを磁界で水面上に凝集させ水面の隆起量をレーザ干渉光強度で測定するレーザ磁気免疫測定方法における前記磁性体微粒子は、アミノ化デキストラン被覆磁性微粒子の複数個が結合してなるものであることを特徴とするものである。

【0010】請求項2に記載のレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子の作製法は、上記課題を解決するために、請求項1に記載のレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子をアミノ化デキストラン被覆磁性微粒子と2官能性架橋剤を油中で混合攪拌し液滴を生成後、当該液滴内でアミノ化デキストランのアミノ基間で架橋反応を起こし、アミノ化デキストラン被覆磁性微粒子を複数個結合させることにより作製することを特徴とするものである。

【0011】請求項3に記載のレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子の作製法は、上記課題を解決するために、請求項2に記載のレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子の作製法における液滴を生成する際に、アミノ化デキストラン被覆磁性微粒子と2官能性架橋剤に、さらに界面活性剤を添加し油中で混合攪拌して、液滴を生成させることを特徴とするものである。

【0012】

【作用】本発明におけるレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子は、アミノ化デキストラン被覆磁性微粒子の複数個が結合してなるものであり、こうして前記磁性微粒子を複数個結合させることにより、1個あたりの磁性体量を増大させ、磁気特性の向上を図ったものである。また、上記のように磁性微粒子が複数個の結合されてなる本発明の磁性微粒子は、その大粒化により、磁界による吸引力がブラウン運動によって阻害されることを回避し、前記磁気特性の著しい向上を可能としたものである。

【0013】また、上記の本発明のレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子の作製法は、アミノ化デキストラン被覆磁性微粒子と2官能性架橋剤を油中で混合攪拌し液滴を生成後、当該液滴内でアミノ化デキストランのアミノ基間で架橋反応を起こすことにより、アミノ化デキストラン被覆磁性微粒子を複数個結合させてなる、大粒径の本発明の磁性微粒子の生成を可能としたものであり、上記のアミノ化デキストラン被覆磁性微粒子と2官能性架橋剤を油中で混合攪拌し液滴を生成する際に、さらに界面活性剤を添加することにより、より分散性の良い大粒径の磁性微粒子を効率良く作製することが可能である。

【0014】従って、上記のように大粒径の分散性の良好な磁性微粒子をレーザ磁気免疫測定方法に適用することにより、レーザ磁気免疫測定方法の高感度化を図り、そのデータの信頼性の高めることができる。

【0015】

【実施例】以下に、図面を参照しつつ本発明を具体的に詳細するが、以下に開示する実施例は本発明の単なる一例にすぎず、本発明の範囲を何等限定するものではない。

(実施例1) 以下に、本発明における実施例1のレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子の作製法について詳細する。

まず、アミノ化デキストランを以下の方法により合成した。平均分子量が4万のファルマシア製デキストラン20gを0.05Mのアセテート緩衝液(pH6.5)100mlに溶解し、これを2.14gの過ヨウ素酸ナトリウムで室温にて1.5時間かけて酸化した。酸化したデキストランは純水で180mlに希釈し、氷酢酸で予めpH9以上に調整した6Mのジアミノエタン20mlを23℃で1時間反応させた。反応後、NaBH₄で還元シクエンチングし、さらに、その溶液をニトロセルロース透析膜を用いて4リットルの純水によって1昼夜透析し、未反応物を除去した。

【0016】そして、上記のように得られたアミノ化デキストランを5ml秤量し、このアミノ化デキストランに、塩化第二鉄六水和物0.75gと塩化第一鉄四水和物0.32gとを混合し、さらにこれに7.5%アンモニア水溶液を室温にて激しく攪拌しながら注意深く1ml添加する。添加後pHが高まると磁性微粒子が生じ黒膜を形成する。そして、黒膜生成後、この温度を1時間で70℃まで徐々に上げ、全量20mlの7.5%アンモニア水溶液を激しく攪拌しながら添加し、アミノ化デキストラン被覆磁性微粒子を作製した。

【0017】そこで、以上の方法によって得られたアミノ化磁性微粒子を用いて、本発明の架橋剤による液滴中での大粒径の磁性微粒子の作製法を以下に詳細する。まず、上記のように作製したアミノ化デキストラン磁性微粒子(鉄濃度10⁻⁶g/ml)をリン酸バッファー溶液(PBS)により10倍に希釈し、この希釈物1ccに、Pierce社製Bis(sulfosuccinimidyl)suberate(以下、BS₂と略記する。)を0.5mg溶解する。上記BS₂をより溶解し易くするには、前記BS₂をあらかじめジメチルホルムアミド30μlに溶解したものを混合すると良い。

【0018】そして、上記混合物に市販サラダオイル50ccと市販界面活性剤TWEEN 20(0.1%)500μlを添加し、ホモジナイザで激しく攪拌して、磁性微粒子を含む逆ミセル状液滴の懸濁液を作製する。そしてさらに、この懸濁液を37℃の恒温槽中に静置し30分間架橋反応させる。その後、エタノールを50cc加えて、よく振とうさせ、分離ロートで下層(油層)を除き、さらにエタノールを50cc加えて、5000rpmで10分間遠心分離機にかけ上清を捨てる。この操作を2回繰り返して、最終的に前記エタノールを0.05%ウシ血清アルブミン(BSA-HEPES)5ccを含んだバッファー溶液に置き換える。

【0019】なお、2液を攪拌機で懸濁した時の液滴の平均粒径はR.Arshadyの「Microspheres and Microcapsules: A Survey of Manufacturing Techniques」(POLYMER ENGINEERING AND SCIENCE, VOL. 29, NO. 24, pp174

6-1758) で詳細に検討されて、次式で表わされることが分かっている。

$$\langle d \rangle \propto k (D_v \cdot R \cdot v_d \cdot S) / (D_s \cdot P \cdot v_m \cdot C)$$

ここで、 $\langle d \rangle$ ：平均粒径、 k ：装置定数、 D_v ：容器の直径、 D_s ：攪拌子の直径、 R ：懸濁液に対する液滴の体積比、 P ：攪拌の回転数（またはパワー）、 v_d ：液滴の粘土、 v_m ：懸濁液の粘土、 S ：懸濁液と液滴間の表面張力、 C ：安定剤の濃度である。

【0020】上式から液滴の粒径を決定する材料的因子は、液滴の粘土、懸濁液の粘土、液滴と懸濁液間の表面張力である。それ故、本発明においてはアミノ化デキストラン被覆磁性微粒子の濃度、使用する油の種類、界面活性剤の種類、濃度等について幅広い範囲で検討した。上記の実施例で例示したものはこれらの代表的な種類、

数値であって、これに規定されるものではない。例え *

表1 磁性微粒子の平均粒径

作製法	平均粒径
本法	295 nm
従来法	73 nm

【0023】また、磁気特性はレーザ磁気免疫測定方法で評価した。レーザ磁気免疫測定方法では、一定の磁界中で磁性微粒子を水面上の1点に凝集させ、その凝集力を盛り上がり量に対応したレーザ干渉強度から求める方法である。このため、一定磁界に対する磁性微粒子の磁気特性は、磁性微粒子中のマグネタイト量と干渉光強度

の関係で評価できる。
【0024】測定結果を図1に示す。(a)は本発明で得られた大粒径磁性微粒子、(b)は従来の重合方法で得られた磁性微粒子の測定結果を示している。図1の縦軸は、干渉光強度、即ち磁気特性の大きさに比例する量であり、横軸は測定した磁性体の鉄濃度を示している。図1から明らかなように、本実施例1で得られた大粒径磁性体は、従来の重合方法で合成された磁性微粒子と比較して、同一の干渉光強度を得るための磁性体量はほぼ100分の1である。

【0025】以上の結果から、磁性微粒子を大粒化することによって、レーザ磁気免疫測定方法における感度は飛躍的に増大する効果があることが分かった。これは、磁性微粒子1個当たりの磁気特性は含有される磁性体量に比例するためである他に、これまでの重合方法では、得られる磁性微粒子が100nm以下の粒径であるために、磁界による吸引力がブラウン運動によって大きく阻害されていたことに影響されていたためと考えられる。

【0026】(実施例2) 本実施例2においては、腫瘍マーカーの一種である α -フェトプロテインを用いて、本

*ば、懸濁液となる油は市販サラダオイル以外に胡麻油、綿実油あるいはトルエン/クロロホルム、シクロヘキサン/クロロホルムなどが使用できる。また、架橋剤はアミノ基同士を架橋するものであれば良く、上記BS、以外にもジサクシニミジル スベレートやジチオビス スクシニミジルピオネートなどやグルタルアルデヒドを用いることができる。

【0021】そこで、上記のようにして得られた大粒化磁性微粒子の平均粒径を静的光散乱法から求めた。表1は磁性微粒子の平均粒径であって、本発明方法で得られた磁性微粒子は従来法の約4倍の粒径を持つことが分かる。これから本発明方法で作成した磁性微粒子は重合する前の磁性微粒子を4の3乗倍程度結合し、大粒化したものと考えられる。

【0022】

【表1】

発明で得られたレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子の免疫測定における検出感度を測定した。検体調製は、以下の方法により行なった。まず、抗体を結合したポリマビーズ(ビーズ濃度0.2wt%)浮遊液20 μ l、抗原として α -フェトプロテインの希釈液(蛋白濃度10 $^{-11}$ ~10 $^{-8}$ g/ml)の範囲で10倍希釈、8段階)の各段階20 μ lを37℃、2時間反応させた。次に、各反応液にビオチンを結合した抗 α -フェトプロテイン抗体(抗体濃度0.3mg/ml)を20 μ l添加し、37℃で1時間反応させ、未反応ビオチン化抗体をB/F分離した。

【0027】さらに、B/F分離した各反応液に、本発明で得られた磁性微粒子に予めPierce社製BS₂を用いてアジピンを結合させたアジピン化磁性微粒子(マグネタイト濃度0.1mg/ml)を20 μ l添加し、37℃で1時間反応させた。そして、反応後に未反応の磁性微粒子をB/F分離し、30 μ lの緩衝液で反応物を回収し測定検体とした。

【0028】以上のように得られた各測定検体をレーザ磁気免疫測定装置で測定し、その干渉光強度を得た。その結果を図2(a)にて示す。一方、従来法で得られた磁性微粒子を用いて、上記と全く同様の検体を調製し、レーザ磁気免疫測定装置で測定した干渉光強度を図2

(b)に示す。図2から明らかなように、本発明で得られた大粒径磁性微粒子を用いた検体は、従来の磁性微粒子を用いた検体に比べ、抗原の低濃度領域での感度が1

倍以上向上していることが分かる。

【0029】以上のように、本発明によるレーザ磁気免疫測定用磁性体は、粒径が大きくかつ分散性が良いため、これをレーザ磁気免疫測定方法に適用した場合には、その感度を著しく向上させることができる。

【0030】

【発明の効果】本発明におけるレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子は、アミノ化デキストラン被覆磁性微粒子の複数個が結合してなるものであり、こうして前記磁性微粒子を複数個結合させることにより、1個あたりの磁性体量を増大させ、磁気特性の向上を図ったものである。また、上記のように磁性微粒子が複数個の結合されてなる本発明の磁性微粒子は、その大粒化により、磁界による吸引力がブラウン運動によって阻害されることを回避し、前記磁気特性の著しい向上を可能としたものである。

【0031】また、上記の本発明のレーザ磁気免疫測定用磁性微粒子の作製法は、アミノ化デキストラン被覆磁性微粒子と2官能性架橋剤を油中で混合攪拌し液滴を生成後、当該液滴内でアミノ化デキストランの2官能基間で架橋反応を起こすことにより、アミノ化デキストラン*

*被覆磁性微粒子を複数個結合させてなる、大粒径の本発明の磁性微粒子の生成を可能としたものであり、上記のアミノ化デキストラン被覆磁性微粒子と2官能性架橋剤を油中で混合攪拌し液滴を生成する際に、さらに界面活性剤を添加することにより、より分散性の良い大粒径の磁性微粒子を効率良く作製することが可能である。

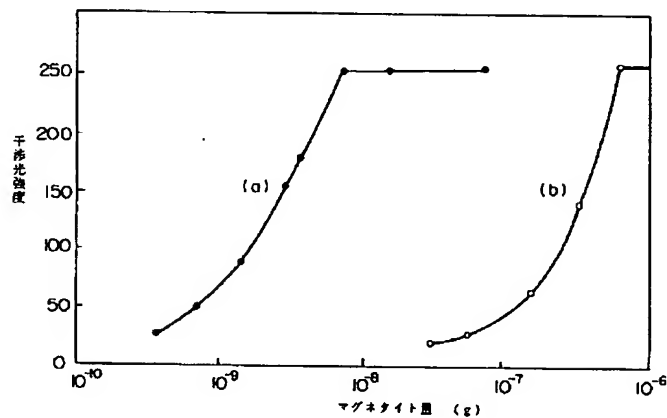
【0032】従って、上記のように大粒径の分散性の良好な磁性微粒子をレーザ磁気免疫測定方法に適用することにより、レーザ磁気免疫測定方法の高感度化を図り、そのデータの信頼性の高めることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明における実施例1に基づく磁性微粒子のマグネタイト量と干渉光強度の関係を示したものであって、図中曲線(a)は本発明の作製法で得られた大粒径磁性微粒子、(b)は従来法で得られた磁性微粒子を用いた測定結果である。

【図2】図2は、本発明における実施例2に基づく α -フェトプロテイン抗原検出の実験結果であって、図中(a)は本発明の作製法で得られた大粒径磁性微粒子、(b)は従来法で得られた磁性微粒子を用いた結果を示している。

【図1】



【図2】

